ХІРУРГІЯ

УДК 616.36-073.584-06

ВИКОРИСТАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ СИРОВАТКИ КРОВІ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ ПЕЧІНКИ

Чопей І.В., Бандурин О.Ю., Сіксай Л.Т., Бандурин Ю.А.

Ужгородський національний університет, кафедра терапії та сімейної медицини факультету післядипломної освіти; Медичний факультет, кафедра пропедевтики внутрішніх захворювань, м. Ужгород

Ключові слова: фотолюмінесценція, сироватка крові, спектри випромінювання

Вступ. На сьогоднішній день неухильно зростає захворюваність органів травлення, з'являються нові, екологічно обумовлені захворювання. Стрімко зростає і кількість гострих та хронічних захворювань печінки внаслідок сильного впливу різних екологічних факторів. Серед основних джерел їх виникнення – вірусні інфекції (включаючи появу нових штамів та мутації існуючих), отруєння хімічними речовинами (в тому числі лікарськими препаратами), зловживання алкоголем, наслідки опромінення радіонуклідами [3]. Ще очікують своєї об'єктивної оцінки в цьому аспекті наслідки повеней на Закарпатті. Саме тому актуальність розробки надійних критеріїв діагностики функціонального стану печінки, контролю за якістю її лікування набуває особливої ваги. Існуючі методи діагностики захворювань печінки можна умовно розподілити на декілька груп: клінічні методи, біохімічні, морфологічні, імунологічні, ультразвукові, оптичні, радіоізотопні, рентгенологічні та ендоскопічні [2]. Кожен з цих методів має свої недоліки та переваги, і жоден не є абсолютним.

На сьогоднішній день в повсякденній практиці часто спостерігається нечіткість клінічних симптомів давно відомих захворювань, що негативно відбивається як на діагностиці, так і на лікуванні захворювань. В зв'язку з цим особливе значення набуває використання існуючих та розробка нових - доступних та інформативних – методів, використання яких доповнило б діагностичний арсенал лікувальних установ та сприяло підвищенню достовірності постановки діагнозу.

Одним з перспективних напрямків сучасного розвитку діагностичних методик є використання фізичних методів дослідження властивостей біологічних об'єктів. Отримана за їх допомогою інформація відрізняється високим рівнем достовірності, об'єктивністю, швидкою обробкою даних за допомогою обчислювальної техніки. Одним із таких методів є люмінесцентний аналіз біологічних рідин людей. Люмінесцентні методи здавна використовуються в медицині, але їх застосування обмежувалося люмінесцентним аналізом наявності тих чи інших компонентів в біологічних препаратах (флуоресцентна мікроскопія) [9].

Тільки в останні декілька років [1, 4 ,10, 11] набули широкого розповсюдження роботи по встановленню кореляції між характером та ступенем важкості захворювання людини та особливостями в спектрах фотолюмінесценції його біологічних рідин (кров, слина, сеча). Цьому в значній мірі сприяли швидкий розвиток систем реєстрації флюоресценції та обчислювальних систем обробки даних, вдосконалення джерел випромінювання та ін.

Здається перспективним медичне застосування фотолюмінесценції рідин в оптичному діапазоні в декількох напрямках. По-перше, це вивчення характеристик СФСК здорових людей та хворих (патологіями печінки та ін.), з одночасним використанням цієї методики для діагностики захворювань [5, 4, 10, 12]. По-друге, вивчення люмінесценції різноманітних розчинів крові (з фізрозчином, ацетоном, та ін.), а також розчинів крові з введенням додаткових флуорофорів [9, 11, 8 - 12]. По-третє, вивчення люмінесценції тканини печінки та внутрішніх органів з використанням ендоскопії, а також люмінесцентне дослідження біоптатів різних тканин [1, 9].

Зокрема, по даним робіт [10, 12] збудження людської сироватки випромінюванням лазеру з довжиною хвилі 355 нм супроводжується флуоресценцією, яка спричинена переважно релаксацією ліпофільних молекул. В більшості

випадків це альбуміни та ліпопротеїди низької та дуже низької щільності. На підставі розробленого авторами алгоритму та за допомогою аналізу параметрів спектрів люмінесценції (довжина хвилі максимуму емісії, його інтенсивність та співвідношення інтенсивностей флуоресценції зліва та справа від максимуму) можна проводити диференціацію СНІД-інфікованої (або інфікованої вірусами гепатиту В, С) плазми від неінфікованої [10, 12]. Безумовно позитивним кроком слід визнати дії компанії SerOptix як в напрямку створення компактних приладів з використанням мікролазерів для вивчення фотолюмінесценції, так і по створенню спектроскопічної бази даних по люмінесценції як окремих молекулярних компонент крові, так і різноманітних їх комбінацій та розчинів.

В роботі індійських вчених [6] в спектрах флуоресценції сироватки крові практично здорових людей та хворих з різними патологіями печінки (лептоспіроз, печінкова недостатність, гепатит) знайдені особливості в спектральному діапазоні 400-600 нм, які також дозволяють проводити діагностику захворювань печінки. При наявності патології печінки відбувалося зміщення положення максимуму інтенсивності в довгохвильову область спектру та спостерігався додатковий пік випромінювання при 615 нм, який автори пояснили наявністю ендогенного порфірину. При цьому показано, що наявність інших захворювань не впливає на особливості спектрів у цьому діапазоні довжин хвиль.

Звертає на себе увагу, що до теперішнього часу однозначно не встановлені молекули, що відповідають за фотолюмінесценцію в діапазоні довжин хвиль від 400 до 600 нм, а саме в цій ділянці спектру розташоване найбільш інформативне випромінювання люмінесценції. Окремі дослідження показують, що тут можна спостерігати випромінювання жовчних кислот (520 нм), НАДФ (465нм), ендогенних порфіринів і їхніх похідних, похідних рибофлавінів, альбумінів, та ліпопротеїдних комплексів різної щільності. Встановлення природи випромінювачів залишається надзвичайно актуальним і в той же час дуже складним завданням. Це завдання ускладнюється ще й тим, що при поглинанні УФ-випромінювання в сироватці крові (або в розчинах крові) відбуваються вільнорадикальні реакції з фотолізом білків та перекисним окисленням ліпідів. Крім того, великий вплив мають процеси міжмолекулярної взаємодії (зіткнення молекул з перерозподілом енергії збудження). Не сприяє вирішенню цієї задачі і використання спектральної апаратури з різною чутливістю в різних лабораторіях світу, а також використання різних джерел світла для опромінення рідин.

Метою даної роботи був аналіз відмінностей у спектрах фотолюмінесценції сироватки крові людей з різними захворюваннями печінки.

Матеріали та методи дослідження. Нами продовжено розробку і вдосконалення техніки і методики вимірювань спектрів фотолюмінесценції сироватки крові (СФСК). З їх допомогою накопичуються дані про особливості СФСК групи практично здорових людей (донорів), а також хворих різними хронічними захворюваннями печінки. Детально техніку і методику вимірювання СФСК описано в [4]. Зазначимо лише, що в цій роботі нами проведені вимірювання спектрів люмінесценції, що збуджувались різними джерелами УФ-випромінювання. Дослідження проводились на одних зразках сироватки та із застосуванням світлофільтрів: УФС-5, який не пропускає випромінювання з довжиною хвилі більше ніж 300 нм (встановлений перед кюветою з сироваткою), та БС-5 з початком смуги пропускання ~ 400 нм (який розміщався перед вхідною щілиною монохроматора). Вимірювання СФСК з дейтерієво-водневою лампою ДВС-25 і ртутною лампою у порівнянні з випадком збудження лампою високочастотного розряду ВСБ-2 з цинковим наповнювачем показали ідентичність форм спектрів. Проте, в перших двох випадках спостерігається набагато менший квантовий вихід люмінесценції, тому більша частина досліджень виконана саме з використанням лампи ВСБ-2. Таким чином, кювета з досліджуваною рідиною опромінювалась практично монохроматичним світлом з довжиною хвилі 213,9 нм (резонансна лінія атома цинку). Це дуже важливо, оскільки аналіз літературних даних показує, що найбільш інформативні результати отримуються в різних лабораторіях світу при використанні збуджуючих фотонів з довжиною хвилі менше ніж 270 нм. Значну роль відіграє також і густина потоку збуджуючих фотонів, оскільки ефективність процесу фотозбудження є низькою [9].

У процесі відпрацювання методики вимірювань спектрів фотолюмінесценції нами проведені дослідження впливу розсіяння світла на оптичних неоднорідностях стінок кювети, а також тестові експерименти з водою та спиртовими розчинами різних концентрації. Для прикладу на рис. 1 приведені СФСК здорової людини та спектри порожньої кювети і кювети з водою. Як видно із рисунка, вплив розсіяного стінками кювети світла не є визначальним при вимірюванні СФСК.

Окрім досліджень люмінесценції сироватки крові нами також проводились тестові експерименти по люмінесценції цільної крові, які показали відсутність яскравих особливостей у спектрі. Це добре узгоджується з даними робіт [8, 10, 7] і свідчить про значний вплив поглинання світла гемоглобіном у цій області спектру. Крім того, вивчались також спектри поглинання сироватки крові. В якості джерела неперервного випромінювання нами використано еталонну вольфрамову лампу СІ 8-200: в цьому інтервалі довжин хвиль (400-630 нм) вона має характерне випромінювання, що описується формулою Планка.

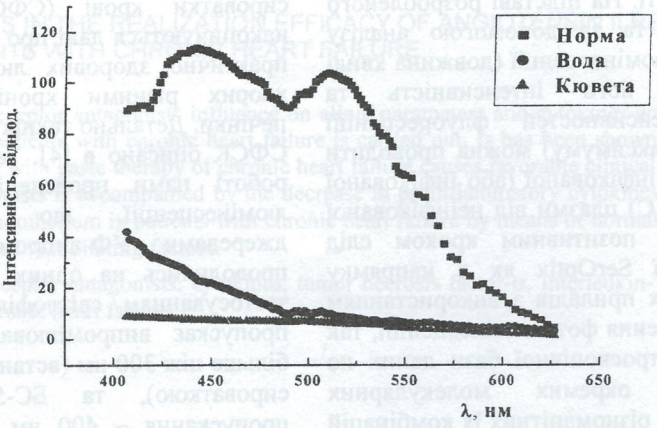

Рис. 1. Порівняння спектрів, отриманих при опроміненні порожньої кювети, кювети з водою та сироваткою кров здорової людини (норма).

Результати та їх обговорення. Для групи практично здорових людей у спектрах завжди спостерігаються два чітко виражені максимуми випромінювання, при λ_1 = 510 нм та λ_2 = 470 нм. Як показали дослідження, стать та вік донорів не впливає помітно на форму спектру та інтенсивність його максимумів. Перевірка впливу патологічних факторів (нефрит, серцево-судинні захворювання) на форму СФСК в дослідженому інтервалі довжин хвиль показала, що особливості спектрів пов'язані лише з патологіями печінки. Форма спектру люмінесценції лиш частково залежить від групи крові пацієнта. Поблизу довжин хвиль 470 і 510 нм спостерігається незначний перерозподіл інтенсивностей випромінювання при збереженні загального ходу кривих. Природа цих максимумів випромінювання поки що не встановлена, оскільки сироватка крові являє собою надзвичайно складний об'єкт. Можна лише зазначити, що жодна молекула з відомою формою спектру люмінесценції, або комбінація молекул (гемоглобін, порфірин, тирозин, фенілаланін, триптофан, колагени, еластин, флавіни та ін.) не є відповідальними за появу спектру такої форми, яку ми спостерігали. Максимуми випромінювання поблизу 470-480 нм спостерігались у різних лабораторіях світу для багатьох молекул, спектри яких описані в літературі. При цьому саме цей інтервал довжин хвиль розглядається як базовий для визначення норми. Проте єдиної думки щодо природи випромінювача в цій ділянці спектру не існує. Так, автори [7] вважають, що це може бути молекула НАДФ або піридиннуклеотиди. В той же час аналогічний максимум спостерігався при вивченні люмінесценції тканин печінки [1], що не можна пояснити випромінюванням цих молекул. На думку американських фахівців [10, 12], найімовірніше - це альбуміни або ліпопротеїдні комплекси. Наші експерименти з сироваткою крові [4], яку було піддано різному часу центрифугування, показують, що молекули, відповідальні за виникнення цього максимуму, мають належати до молекул середнього розміру. І саме ліпопротеїдні комплекси є такими молекулами.

Що стосується другого максимуму в спектрах люмінесценції поблизу 510-520 нм, то при відсутності патологій печінки можливими випромінювачами цього максимуму можуть бути похідні рибофлавіну [9, 5] або ж жовчні кислоти [1]. Не виключено також, що певний вклад може внести люмінесценція вітамінів, які зазвичай випромінюють в цій області спектру. Крім того, максимум поблизу 510 нм спостерігається в спектрах нативної крові та у лімфоцитів з ізотіоціанатом [7].

Для перевірки способу збудження флуорофорів сироватки крові нами також виконано експерименти по вивченню її поглинання в спектральній області 400-630 нм. В якості джерела світла використовувалась еталонна вольфрамова лампа, яку було розташовано вздовж оптичної вісі монохроматора. У випадку, якщо вишеперераховані молекули збуджуються за рахунок прямих процесів (тобто поглинання фотону безпосередньо призводить до збудження їх електронних станів), то в спектрах поглинання на цих довжинах хвиль мають спостерігатися мінімуми. Проте спектри поглинання сироватки крові не мають яскравих особливостей і являють собою плавного виду криві, що спадають в короткохвильову область спектру. Це свідчить про те, що збудження молекул-флуорофорів при опроміненні сироватки УФ-світлом має непрямий характер. Тобто, молекули, які потім випромінюють, збуджуються в процесах зіткнення з іншими молекулами, які поглинули фотони і знаходяться у збудженому стані. На користь такого висновку свідчить також і той факт, що однакові спектри люмінесценції можна отримати при використанні УФ-джерела з різною довжиною хвилі. Однак квантовий вихід є найбільшим в випадку застосування найбільш короткохвильового УФ-випромінювання.

Отримані нами дані свідчать про те, що наявність патологій печінки супроводжується певними змінами в СФСК [6]. А саме: зменшенням інтенсивності випромінювання люмінесценції, зміщенням максимумів випромінювання в довгохвильову область спектру або зникненням одного з них. Разом з тим, існує зворотній зв'язок, коли покращення стану хворих гепатитом після проведеного лікування супроводжується збільшенням інтенсивності випромінювання. Особливо виражені ці зміни були в короткохвильовій області спектру (поблизу довжини хвилі λ_2) в порівнянні з довгохвильовою λ_1.

Співвідношення інтенсивностей випромінювання люмінесценції поблизу значень λ_1 та λ_2 специфічне тим, що дає можливість запропонувати спрощену методику проведення тесту. Для цього, замість вимірювання спектрів фотолюмінесценції необхідно визначити відношення інтенсивностей люмінесценції сироватки крові на двох фіксованих значеннях довжин хвиль. Таким чином, визначивши довжини хвиль, на яких чіткіше буде проявлятися різниця в інтенсивностях випромінювання між різними патологіями з одного боку, та нормою з другого, можна замість монохроматора встановити перед ФЕП інтерференційні світлофільтри. Потім проводити вимірювання інтегральної інтенсивності випромінювання, яке проходить через кожен із світлофільтрів. Тобто, вимірюється величина, яка пропорційна кількості фотонів, що випромінюється рідиною в одиницю часу в вузьких спектральних інтервалах. В результаті отримуються дві величини інтенсивності люмінесценції I_1 та I_2, чисельне значення співвідношення яких ($N = I_1 / I_2$) можна використати для діагностики патологій печінки.

При аналізі отриманих нами даних по СФСК 63 практично здорових людей нами були вибрані довжини хвиль λ_1=510,0 нм та λ_2=454,0 нм, на яких найбільш ефективно проявляється різниця між особливостями спектрів групи практично здорових осіб та особливостями СФСК хворих з патологіями печінки. У відповідності до обраних довжин хвиль підбирались інтерференційні світлофільтри. Для вимірювання I_1 використовувався світлофільтр № 91242 з довжиною хвилі в максимумі пропускання $\lambda_{макс}$=516,0 нм. Коефіцієнт пропускання випромінювання в максимумі складає 48%. Спектральна напівширина пропускання фільтра становила 10 нм, а повна ширина смуги пропускання фільтра - 30 нм. Для вимірювання I_2 використовувався інтерференційний фільтр № 91240 з довжиною хвилі в максимумі пропускання $\lambda_{макс}$=455,0 нм. Коефіцієнт пропускання випромінювання цього фільтру в максимумі 25%. Спектральна напівширина пропускання фільтра становила 8 нм, а повна ширина смуги пропускання фільтра становила 24 нм.

При заміні монохроматора інтерференційними світлофільтрами щонайменше на порядок величини зростає інтенсивність реєстрованого випромінювання люмінесценції. В зв'язку з цим різко скорочується експозиційний час вимірювань. Для отримання більш достовірних даних, оскільки мова йшла про відпрацювання методики фотолюмінесцентного тесту, сигнал накопичувався впродовж 5 сек. для кожного вимірювання. Оскільки за цей час накопичувалось від $7 \cdot 10^4$ імпульсів (у випадку практично здорових осіб) до $5 \cdot 10^2$ імпульсів (у випадку мінімальної інтенсивності люмінесценції для групи хворих злоякісними новоутвореннями печінки), то в робочих умовах можна зменшити час експозиції до 1 сек. Тому мінімальний час проведення тесту по цій методиці пов'язаний лише з часом, необхідним для отримання сироватки, оскільки з моменту встановлення кювети на оптичну вісь весь цикл вимірювання величин I_1 та I_2 складає менше 10 сек.

Результати вимірювань величин N (з урахуванням коефіцієнтів пропускання інтерференційних фільтрів) та межі довірчого 95% інтервалу знаходження цих величин представлені в узагальненому вигляді в таблиці 1.

Таблиця 1

Визначені величини відношення інтенсивностей люмінесценції $N = I_1 / I_2$ сироватки крові для двох довжин хвиль λ_1=510,0 нм та λ_2=454,0 нм

Вид патології	Кількість обстежених	Середньоарифметичне значення N	Межі довірчого інтервалу, ±
Контрольна група	32	0,87	0,03
Гепатити	35	1,05	0,03
Цирози печінки	31	1,35	0,04
Злоякісні новоутворення печінки	11	7,5	0,66

Виявлено, що для групи практично здорових осіб середні значення N знаходяться в межах 0,8 - 0,95, для групи хворих вірусним гепатитом – 1,0 - 1,1, для групи хворих цирозом – 1,1 - 1,5, а в випадку хворих злоякісними новоутвореннями печінки цей показник становив 5 - 10. Ці данні свідчать про можливість проведення фотолюмінесцентного тесту на наявність або відсутність вищевказаних патологій печінки. На наш погляд, інформація, отримана таким шляхом, без сумніву являє собою інтерес для практичного використання не тільки в випадках патологій з неявно вираженими ознаками, але і допоможе правильно встановити діагноз у випадках, коли

результати інших методів досліджень виявляються неінформативними.

Висновки. Отримані нами результати дозволяють припустити, що за особливості спектрів фотолюмінесценції сироватки крові при її збуджені УФ-світлом відповідальні ліпопротеїдні комплекси. Пропонується новий метод діагностики захворювань печінки, в основу якого покладено визначення величини відношення інтенсивностей люмінесценції сироватки крові N, що виміряні на двох довжинах хвиль λ_1=516,0 нм і λ_2=455,0 нм. В залежності від значення величини N можна діагностувати такі захворювання печінки як гепатит, цироз, злоякісні новоутворення печінки, або їх відсутність. Запропонований тест доступний до використання в широкій клінічній та поліклінічній практиці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гираев К. М. Лазеро-индуцированная флуоресценция спектроскопия в гепатологии //Сборник научн. трудов Дагестанского Государственного университета.- 2002.- №1.- С. 136-139.
2. Подымова С.Д. Болезни печени. -М.: Медицина.- 1998.- 213 с.
3. Сиксай Л.Т. Функциональное состояние печени под воздействием различных ендо- и екзоекологических факторов //Дисс. … д. м.н. Ужгород.- 1993.- 347 с.
4. Сіксай Л.Т., Бандурин О.Ю., Бандурин Ю. А. Спектри фотолюмінесценції сироватки крові та їх використання для діагностики захворювань печінки //Науковий вісник Ужгородського університету, серія "Медицина".- 2000.- Вип.11.- С. 177-183.
5. Слобожанина Е.И., Баран В.М., Рубенчик А.Я., Черницкий Е.А. Применение люминесценции плазмы крови для дифференциальной диагностики механической желтухи и вирусного гепатита. //Здравоохранение Беларуссии.- 1989.- № 5.- С. 51-53.
6. Ganesan, S., Madhuri, S., Aruna, P., Suchitra, S., Srinivasan, T.G. Native fluorescence characterization of human liver abnormalities //Proc. SPIE: Optical Diagnostics of Biological Fluids IV.- 1999.- Vol. 3599.- P. 20-24.
7. Gaigalas AK, Wang L, Henderson O, Vogt RF, Barr J, Marti G, Weaver J, and Schwartz A T. The Development of Fluorescence Intensity Standards. //Journal of Research of the Nat. Institute of Standards and Technology.- 2001.- v. 106.- P. 381-398.
8. Kasten, F.H. Introduction to Fluorescent Probes: Properties, History and Applications. //In: Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, W.T. Mason, Ed.: Academic Press.- 1993.- P. 12–33.
9. Lakowicz J. R. "Principles of fluorescence spectroscopy". - Plenum Press.- New York.- 1999-. Vol. 2. -155 p.
10. Theodore E. Maione, Yongwu Yang, Wang Long Zhou et al. Seroptix Inc., Woburn Development And Testing Of An Intrinsic Fluorescence Assay For Identifying HCV-Infected Plasma //Transfusion, the journal of the American association of blood banks. - 2001. - Vol. 41, No. 9S. - P. 77-78.
11. Ultraviolet fluorescence spectroscopy of blood plasma in the discrimination of cancer from normal. /Madhuri, S., Aruna, P., Summiya Bibi, M.I. et al. //Proc. SPIE Optical Diagn. of Biol. Fluids and Advanced Techn. in Anal. Cytology. - 1997. - Vol. 2982. - P. 41-45.
12. United states patent №224141 Intrinsic fluorescence assay for viral infectioned plasma. Given to SerOptix, Inc. (Woburn, MA). - 2001.- 15 p.

SUMMARY

THE USING OF BLOOD SERUM PHOTOLUMINESCENCE SPECTRA FOR DIAGNOSTICS OF LIVER DISEASES

Chopey I.V., Bandurin O.Yu., Siksay L.T., Bandurin Yu.A.

Studies of blood serum photoluminescence spectra were carried out during its irradiation by ultraviolet light. The presences of certain peculiarities in the luminescence spectra in wavelength range 400-630 nm were experimentally demonstrated. Certain parameters of photoluminescence spectra were correlated unambiguously with the presence of some liver diseases (hepatitis, cirrhosis, cancer). New method of liver diseases diagnostics was proposed and tested, being based on the measurements of relationship of photoluminescence intensities, which were measured at two fixed wavelengths.

Key words: serum of blood, photoluminescence, diseases diagnostic, spectra of radiation